

Fatty liver disease

Citation for published version (APA):

van de Wier, B. (2016). *Fatty liver disease: from pathogenesis to pharmacotherapy*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. <https://doi.org/10.26481/dis.20160705bw>

Document status and date:

Published: 01/01/2016

DOI:

[10.26481/dis.20160705bw](https://doi.org/10.26481/dis.20160705bw)

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

Chapter 8

Summary

The main objective of the studies presented in this thesis was to further elucidate the pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) with an emphasis on the processes of oxidative stress and the onset of inflammation and to find new treatment strategies that target the different pathogenic pathways in NAFLD.

Pathogenesis of NAFLD

The pathogenesis of NAFLD was first regarded to implicate two hits. Steatosis was considered to be the first hit, which would make the liver vulnerable for a second hit that would subsequently induce inflammation. Nowadays, the pathogenesis is regarded as a multiple hits disease (described in **chapter one**). Multiple parallel hits, including metabolic abnormalities, inflammatory pathways and oxidative stress, affect the liver and eventually cause non-alcoholic steatohepatitis (NASH). Although the pathogenesis of NAFLD and NASH is increasingly revealed, there is not yet a complete image of all involved processes and new possible pathogenic mechanisms are continually added.

One of the mechanisms we added is based on the elevated plasma citrate levels we observed in NAFLD patients. In **chapter two** we hypothesized that elevated citrate levels increase oxidative stress in NAFLD patients. Elevated citrate levels could originate from an excessive supply of fatty acids to the liver. Fatty acids, as well as glucose, are broken down into acetyl-CoA. Acetyl-CoA subsequently enters the Krebs cycle, or citric acid cycle, in which it is further processed. In the first step of the Krebs cycle, citric acid is formed from acetyl-CoA and oxaloacetate. In patients with the metabolic syndrome and NAFLD, the influx of acetyl-CoA into the Krebs cycle is expected to be increased due to high levels of free fatty acids and glucose. Because the third step in the Krebs cycle is rate-limiting and the second step is reversible, the high influx of acetyl-CoA will result in the accumulation of citrate. We confirmed that a high supply of fatty acids (palmitic acid) to HepG2 cells leads to increased citrate levels in the cytosol of these cells. Furthermore, we observed that citrate alone, does not increase oxidative stress in HepG2 cells, but citrate combined with hydrogen peroxide further aggravates oxidative stress caused by hydrogen peroxide. This is probably related to the promotion of iron mediated hydroxyl radical formation from hydrogen peroxide by citrate. Interestingly, hepatic iron levels are often elevated in NAFLD patients. Elevated citrate levels in combination with high hepatic iron levels can augment oxidative stress and might contribute to the progression of steatosis into NASH.

Flavonoids in the treatment of NAFLD

Traditionally, drugs are developed to act on one target and in this way lead to absence of disease. Because NAFLD is such a multi-factorial disease, affecting one target, will most likely not treat the disease. This might be an explanation why many examined pharmacotherapies for NAFLD and NASH have failed. We propose that a drug used in the treatment of NAFLD and NASH should affect more targets. Therefore, we further investigated flavonoids, antioxidants that also have anti-inflammatory and metabolic effects.

In **chapter three** we reviewed the biological effects of flavonoids and examined how they could affect the different pathogenic mechanisms of NAFLD. Metabolic effects of flavonoids include stimulation of peroxisome proliferator activated receptors α and γ (PPAR α and PPAR γ), inhibition of sterol regulatory binding protein 1c (SREBP-1c) and liver X receptor α (LXR α) and stimulation of 5' adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK), which lead to an increase in fatty acid oxidation and to a decrease in insulin resistance and lipogenesis. Antioxidant effects of flavonoids comprise the inhibition of the production of reactive oxygen species (ROS) by inhibition of pro-oxidant enzymes and by influencing the metabolic and inflammatory processes that produce ROS. Furthermore, flavonoids are excellent scavengers of ROS and can chelate iron and other transition metals that contribute to the production of ROS, to cause so called 'site-specific scavenging'. Finally, flavonoids can enhance the endogenous antioxidant defense by stimulation of nuclear factor erythroid derived 2 (NRF2). Anti-inflammatory effects of flavonoids include inhibition of nuclear factor κ B (NF- κ B), inhibition of the production of cytokines and prostanoids and a decrease of the expression of adhesion molecules. The effects of flavonoids on NAFLD in animal models were also reviewed in chapter three. Silybin, silymarin, green tea flavonoids, soy isoflavones, quercetin and rutin are the most investigated flavonoids or flavonoid mixtures and were found to have positive effects in animal models of NAFLD. A silybin-phosphatidylcholine complex was also investigated in patients with NAFLD and demonstrated positive effects on markers of hepatic damage, insulin resistance, body mass index and liver histology (only investigated in a part of the participants).

Animal models

Animal models that are used to study the effect of flavonoids were evaluated in chapter three. It was concluded that from the investigated studies, the models using

rats/gerbils on a high fat diet or on a high fat diet combined with high fructose or carbohydrates seem to approximate the conditions of human NAFLD best. Also studies using genetic models combined with a high fat or a methionine choline deficient (MCD) diet can be useful. However, the ideal animal model of NAFLD that mimics liver damage seen in NAFLD patients including steatosis, inflammation and fibrosis, involves the most important pathogenic pathways (metabolic abnormalities, inflammation and oxidative stress) and demonstrates other signs of the metabolic syndrome, has not yet been developed. In **chapter four**, we investigated if a C57Bl6/J mouse with a liver specific superoxide dismutase 2 (SOD2) knock out on a high fat high cholesterol diet can be used as a model to study the onset of inflammation in NAFLD. The mice were compared with wildtype mice and LDL-receptor knock out mice on a high fat high cholesterol diet. Interestingly, the mice with a liver specific SOD knock out did not develop inflammation after three weeks of high fat diet, in contrast to the LDL-receptor knock out mice that did develop inflammation after three weeks of high fat diet.

New treatment strategies for NAFLD

Effect of the flavonoid monoHER in a mouse model of NAFLD

The LDL-receptor knock out mice on a high fat high cholesterol diet were used to study the effect of the flavonoid monoHER on the onset of inflammation in NAFLD in **chapter five**. It was found that although daily treatment with monoHER did not prevent the development of inflammation in these mice, the redox status as well as the adaptive response to oxidative stress tended to be higher in monoHER treated mice, although this did not reach significance on a group level. Interestingly, a within animal relationship was found between a high adaptive response (evidenced by a higher hemoxygenase-1 and glutathione peroxidase 3 expression, indicating NRF2 activation) and a low redox status (evidenced by a lower GSH/GSSG-ratio) in monoHER treated LDL-receptor knock out mice. This relationship was lacking in placebo treated LDL-receptor knock out mice and in placebo and monoHER treated wildtype mice. This demonstrates that monoHER causes a relatively potent adaptation: in mice with a low redox status, monoHER stimulates NRF2 activation, while in mice with a high redox status, no evidence for further stimulation by monoHER was seen, indicating that in the animals that have already adapted, no further adaptation is needed.

Inhibition of cytochrome P450 2E1

In **chapter six** we examined which chemical characteristics of compounds are important for cytochrome P450 2E1 (CYP2E1) inhibition. Since CYP2E1 expression and activity appear to be related to liver damage in NASH patients, but also in patients with alcoholic steatohepatitis (ASH), inhibition of CYP2E1 might hinder the occurrence of these diseases. We observed that lipophilicity is the most important characteristic determining CYP2E1 inhibition. Furthermore, in the case of carboxylic acids or other compounds with charged moieties, interactions with polar residues lining the CYP2E1 active site also have to be considered.

Chapter seven discusses the major findings of this thesis and gives perspectives for future research.

Nederlandse samenvatting

De belangrijkste doelen van de artikelen uit dit proefschrift zijn om de pathogenese van niet alcoholische vetleverziekte (NAFLD) verder te verhelderen, met een nadruk op de processen van oxidatieve stress en het begin van ontsteking, en om nieuwe behandelstrategieën te vinden die aangrijpen op de verschillende pathogenetische mechanismen van NAFLD.

Pathogenese van NAFLD

Eerder werd gedacht dat de pathogenese van NAFLD twee aanvallen of ‘hits’ tegen de lever omvatte. Leververvetting (steatose) werd gezien als de eerste hit, wat de lever kwetsbaar maakte voor een tweede hit die vervolgens tot ontsteking zou leiden. Tegenwoordig wordt NAFLD steeds meer beschouwd als een ziekte waarbij meerdere hits betrokken zijn (**hoofdstuk een**). Multipеле, tegelijk optredende hits, die metabole veranderingen, inflammatoire mechanismen en oxidatieve stress omvatten, treffen de lever en veroorzaken uiteindelijk niet alcoholische vette leverontsteking (NASH). Hoewel er steeds meer bekend wordt over de pathogenese van NAFLD en NASH, hebben we nog geen compleet overzicht van alle betrokken processen en worden er nog altijd nieuwe mogelijke pathogenetische mechanismen toegevoegd.

Een van de mechanismen die wij hebben toegevoegd is gebaseerd op de vondst van verhoogde citraat concentraties in het plasma van NAFLD-patiënten. In **hoofdstuk twee**, hypothetiseerden wij dat verhoogde citraat concentraties oxidatieve stress vergroten in NAFLD-patiënten. Verhoogde citraat concentraties kunnen voortkomen uit een overvloedige aanvoer van vetzuren naar de lever. Vetzuren worden net als glucose afgebroken tot acetyl-CoA. Acetyl-CoA wordt vervolgens verder verwerkt in de citroenzuurcyclus. In de eerste stap van de citroenzuurcyclus wordt citraat gevormd uit acetyl-CoA en oxaloacetaat. Bij patiënten met het metabole syndroom en NAFLD wordt verwacht dat de toevoer van acetyl-CoA in de citroenzuurcyclus verhoogd wordt door hoge glucose en vrije vetzuren concentraties. Omdat de derde stap in de citroenzuurcyclus snelheid beperkend is en omdat de tweede stap reversibel is, zal een hoge toevoer van acetyl-CoA naar de citroenzuurcyclus leiden tot accumulatie van citraat. Wij bevestigden dat een hoge toevoer van vetzuren (palmitaat) naar HepG2 cellen leidt tot verhoogde citraat concentraties in het cytosol van deze cellen. Daarnaast observeerden we dat citraat op zichzelf oxidatieve stress in HepG2 cellen niet vergroot, maar citraat gecombineerd met waterstofperoxide de oxidatieve stress veroorzaakt door waterstofperoxide verder verergerd. Dit is waarschijnlijk gerelateerd aan stimulatie van de ijzer-gemedieerde vorming van

hydroxylradicalen uit waterstofperoxide door citraat. Een interessant gegeven is dat ijzer concentraties vaak verhoogd zijn in de levers van NAFLD-patiënten. Verhoogde citraat concentraties zouden in combinatie met hoge ijzer concentraties oxidatieve stress kunnen verergeren en zo kunnen bijdragen aan de progressie van steatose naar NASH.

Flavonoïden in de behandeling van NAFLD

Traditioneel gezien worden medicijnen ontwikkeld om op één aangrijpingspunt in te werken en zo te leiden tot afwezigheid van ziekte. Omdat NAFLD zo'n multifactoriële ziekte is, zal inwerking op één aangrijpingspunt de ziekte waarschijnlijk niet genezen. Dit zou een verklaring kunnen zijn voor het feit dat veel van de onderzochte farmacotherapieën voor NAFLD en NASH tot op heden gefaald hebben. Wij stellen voor dat een medicijn dat gebruikt wordt voor de behandeling van NAFLD en NASH meerdere aangrijpingspunten moet hebben. Daarom hebben wij flavonoïden verder onderzocht. Dit zijn antioxidanten die tevens anti-inflammatoire en metabole effecten hebben.

In **hoofdstuk drie** hebben wij een overzicht gemaakt van de biologische effecten van flavonoïden en hebben we beschreven hoe deze effecten de verschillende pathogenetische mechanismen van NAFLD kunnen beïnvloeden. Metabole effecten van flavonoïden omvatten o.a. stimulatie van peroxisoom proliferator geactiveerde receptoren α en γ (PPAR α en PPAR γ), remming van sterol regulatory binding protein 1c (SRBP-1c) en lever X receptor α (LXR α) en stimulatie van 5' adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK), welke leiden tot een toename van vetzuur oxidatie en een afname van insuline resistentie en lipogenese. Antioxidant effecten van flavonoïden omvatten o.a. de remming van de productie van vrije zuurstofradicalen (ROS) door remming van pro-oxidante enzymen en door het beïnvloeden van metabole en inflammatoire processen die ROS produceren. Daarnaast zijn flavonoïden uitstekende ROS-wegvangers (scavengers) en kunnen flavonoïden ijzer en andere transitie-metalen die bijdragen aan de productie van ROS cheleren en zo 'site-specific scavenging' uitoefenen. Ten slotte kunnen flavonoïden de endogene antioxidant verdediging verbeteren door stimulatie van nuclear factor erythroid derived 2 (NRF2). Anti-inflammatoire effecten van flavonoïden zijn o.a. remming van nuclear factor κ B (NF- κ B), remming van de cytokine en prostanoïd productie en vermindering van de expressie van adhesie moleculen. De effecten van flavonoïden op NAFLD in proefdiermodellen werden ook beoordeeld in hoofdstuk

drie. Silybine, silymarine, groene thee flavonoïden, soja isoflavonen, quercetine en rutine zijn de meest onderzochte flavonoïden of flavonoïd mengsels. Deze flavonoïden lieten positieve effecten zien in proefdiermodellen van NAFLD. Een silybine-phosphatidylcholine complex werd ook onderzocht in NAFLD-patiënten en veroorzaakte verbetering van markers van leverschade, insuline resistentie, body mass index en lever histologie (de laatste werd alleen onderzocht in een deel van de deelnemers).

Proefdiermodellen

De proefdiermodellen die gebruikt worden om de effecten van flavonoïden te onderzoeken werden beoordeeld in hoofdstuk drie. Hieruit werd geconcludeerd dat, van de onderzochte studies, de studies die ratten of gerbils met een hoogvet dieet met of zonder hoge concentraties fructose en/of koolhydraten gebruikten, humane NAFLD het beste benaderden. Ook studies die genetische modellen gecombineerd met een hoogvet dieet of een methionine choline deficiënt dieet gebruiken, kunnen nuttig zijn. Het ideale NAFLD-proefdiermodel dat de leverschade die gezien wordt in NAFLD-patiënten (steatose, inflammatie en fibrose) nabootst, waarbij de belangrijkste pathogenetische mechanismen (metabole afwijkingen, inflammatie en oxidatieve stress) betrokken zijn en waarbij ook andere kenmerken van het metabole syndroom tot uiting komen, is echter nog niet ontwikkeld. In **hoofdstuk vier** onderzochten wij of een C57Bl6/J-muis met een uitschakeling (knock-out) van superoxide dismutase 2 (SOD2) in de lever op een hoogvet dieet rijk in cholesterol, gebruikt kan worden als proefdiermodel om het begin van inflammatie in NAFLD te onderzoeken. De muizen werden vergeleken met wildtype muizen en muizen met een LDL-receptor knock-out op een hoogvet dieet rijk in cholesterol. De muizen met een SOD2 knock-out in de lever ontwikkelden echter geen inflammatie na drie weken van een hoogvet dieet, in tegenstelling tot de muizen met een LDL-receptor knock-out.

Nieuwe behandelstrategieën voor NAFLD

Effect van de flavonoïd monoHER in een muismodel van NAFLD

De muizen met een LDL-receptor knock-out op een hoogvet dieet rijk in cholesterol werden gebruikt om het effect van de flavonoïd monoHER op het begin van inflammatie in NAFLD te bestuderen in **hoofdstuk vijf**. Hoewel dagelijkse behandeling met monoHER de ontwikkeling van ontsteking in deze muizen niet kon

voorkomen, neigde behandeling met monoHER wel de redox status en de adaptatie op oxidatieve stress te vergroten. Dit was echter niet significant op groepsniveau. Binnen de afzonderlijke met monoHER behandelde LDL-receptor knock-out muizen werd een relatie gevonden tussen een hoge adaptatie op oxidatieve stress (aangetoond door een hogere genexpressie van hemoxygenase-1 en glutathion peroxidase 3, wat wijst op NRF2 activatie) en een lage redox status (aangetoond door een lagere GSH/GSSG-ratio). Deze relatie werd niet gevonden bij met placebo behandelde LDL-receptor knock-out muizen en bij met monoHER of placebo behandelde wildtype muizen. Dit toont aan dat monoHER een relatief effectieve adaptatie veroorzaakt: monoHER stimuleert NRF2 activatie in muizen met een lage redox status, terwijl er geen bewijs wordt gevonden voor verdere stimulatie in muizen die al een hoge redox status hebben. In dieren die zich al aangepast hebben aan hoge niveaus van oxidatieve stress, lijkt geen verdere adaptatie nodig te zijn.

Remming van cytochroom P450 2E1

In **hoofdstuk zes** hebben we onderzocht welke chemische eigenschappen van stoffen belangrijk zijn voor inhibitie van cytochroom P450 2E1 (CYP2E1). Omdat CYP2E1 expressie en activiteit gerelateerd lijken te zijn aan lever schade bij NASH-patiënten, maar ook bij patiënten met alcoholische steatohepatitis (ASH), zou remming van CYP2E1 het optreden van deze ziekten kunnen verhinderen. Wij observeerden dat lipofiliciteit de belangrijkste eigenschap is die CYP2E1 inhibitie bepaald. Daarnaast moet er, in het geval van carbonzuren of andere stoffen met geladen groepen, rekening worden gehouden met interacties met polaire residuen rondom de active site van CYP2E1.

In **hoofdstuk zeven** worden de belangrijkste bevindingen van dit proefschrift besproken en worden vooruitzichten gegeven voor toekomstig onderzoek.

